대한민국특허청
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0090611 호
Application Number 10-2003-0090611

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 12일
Date of Application DEC 12, 2003

출 원 인 : 한국생명공학연구원 외 1명
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, et al.

2004 년 11 월 15 일

특 허 청
COMMISSIONER

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【출원일자】	2003.12.12
【발명의 명칭】	멜라닌 생합성 저해 활성을 갖는 테레인 화합물 및 그의 제조방법
【발명의 영문명칭】	TERREIN COMPOUND HAVING MELANIN BIOSYNTHESIS INHIBITORS AND ITS PREPARATION
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【출원인】	
【명칭】	주식회사 웰스킨
【출원인코드】	1-2000-034471-9
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-029927-3
【포괄위임등록번호】	2003-085783-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유익동
【성명의 영문표기】	YOO,Ick-Dong
【주민등록번호】	460128-1041916
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 현대아파트 103동 501호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김원곤
【성명의 영문표기】	KIM,Won-Gon
【주민등록번호】	641026-1530317
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 102동 508호
【국적】	KR

발명자】
【성명의 국문표기】 유인자
【성명의 영문표기】 RYOO,In-Ja
【주민등록번호】 611027-2350314
【우편번호】 305-340
【주소】 대전광역시 유성구 도룡동 주공아파트 1동 412호
【국적】 KR
발명자】
【성명의 국문표기】 김종평
【성명의 영문표기】 KIM,Jong-Pyung
【주민등록번호】 621031-1581616
【우편번호】 305-755
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125동 505호
【국적】 KR
발명자】
【성명의 국문표기】 이상구
【성명의 영문표기】 LEE,Sangku
【주민등록번호】 610521-1402914
【우편번호】 305-330
【주소】 대전광역시 유성구 지족동 열매마을 아파트 504동 101호
【국적】 KR
발명자】
【성명의 국문표기】 박서형
【성명의 영문표기】 PARK,Seo-Hyoung
【주민등록번호】 760922-2047919
【우편번호】 157-867
【주소】 서울특별시 강서구 화곡본동 56-611 삼성연립 9동 201호
【국적】 KR
발명자】
【성명의 국문표기】 김동석
【성명의 영문표기】 KIM,Dong-Seok
【주민등록번호】 680916-1025719

【우편번호】 132-040

【주소】 서울특별시 도봉구 창동 삼성아파트 102동 206호

【국적】 KR

발명자】

【성명의 국문표기】 박경찬

【성명의 영문표기】 PARK,Kyoung-Chan

【주민등록번호】 550605-1058336

【우편번호】 133-070

【주소】 서울특별시 성동구 행당동 328-1 행당한진타운 118동 201호

【국적】 KR

공지예외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 간행물 발표

【공개일자】 2003.06.24

심사청구】 청구

취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)

수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	4	면	4,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	4	항	237,000 원

【합계】 270,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 135,000 원

첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.공지예외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 테레인 화합물을 함유한 멜라닌 생성 저해제 및 테레인 화합물의 제 방법에 관한 것이다. 상기 테레인 화합물은 국내 토양에 서식하는 곰팡이 페니실 움속 KCTC 26245 균주를 통하여 용이하게 제조할 수 있으며, 특히 타이로시네이즈 대하여 직접적인 억제효과를 나타내지 않지만 멜라닌 색소세포 내에서 K(extracellular signal-regulated kinase) 활성을 촉진하여 TF(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제함으로써 미백 과를 나타내는 것으로, 멜라닌 생성의 억제작용이 기존의 물질들보다 강력하고, 작 기전이 상이하므로 배합 적용시 상승효과를 기대할 수 있어 피부 질환 치료제, 피 미백제 또는 갈변 방지제로 유용하게 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

페실리움, 멜라닌, 저해활성, 미백제, ERK, MITF.

【명세서】

【발명의 명칭】

멜라닌 생합성 저해 활성을 갖는 테레인 화합물 및 그의 제조방법(TERREIN POUND HAVING MELANIN BIOSYNTHESIS INHIBITORS AND ITS PREPARATION)

【도면의 간단한 설명】

도 1은 곰팡이 균주 페니실리움속(*Penicillium sp*) KCTC 26245의 대사산물 etabolite)로부터 테레인을 분리하는 과정을 나타낸 모식도이며.

도 2a는 본 발명의 테레인 화합물의 ^{1}H-NMR(600MHz) 스펙트럼을 측정한 그래프며.

도 2b는 본 발명의 테레인 화합물의 HMBC(600MHz) 스펙트럼을 측정한 그래프이.

도 3은 본 발명의 테레인 화합물에 대한 세포독성 결과를 나타낸 그래프이며.

도 4a는 본 발명의 테레인 화합물의 멜라닌 생성억제작용을 나타낸 래프이며.

도 4b는 표준물질인 코지산의 멜라닌 생성억제작용을 나타낸 그래프이며.

도 4c는 본 발명의 테레인 화합물의 멜라닌 생성억제작용을 나타낸 사진이며.

도 5는 본 발명의 테레인 화합물이 ERK신호전달 경로와 MITF의 발현에 미치는 향에 대한 실험결과이다.

-

발명의 상세한 설명】

발명의 목적】

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 곰팡이 유래의 멜라닌 생합성 저해 활성을 갖는 물질의 신규한 용도 관한 것이다.

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생고분자 물질로 검은 색소와 단백의 복합체로 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이다. 그러나 멜닌의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨 등을 형성하고 피부 노화를 촉진하거나 피암의 유발에 관여하는 것으로 보고 되었다. 또한 오존층의 파괴로 자외선에 노출 심해져 생기는 과잉의 멜라닌 합성은 인체의 피부 노화에 치명적인 해를 가져오고 다. 이에, 강력한 멜라닌 생합성 저해활성 물질의 개발에 많은 노력을 기울이고 다.

멜라닌의 생합성 대사는 피부암과 관련하여 최근 집중적으로 연구되고 있고 이부터 다양한 멜라닌 생성 저해제 등이 개발되어 의약품 산업에서 피부 질환 료제, 화장품 산업에서 기미, 주근깨 등을 예방 및 치료하는 피부 미백제 또는 식 산업에서 갈변 방지제 등으로 적용되고 있다. 또한 최근에는 환경문제와 관련하 그 수요가 급격히 증가되고 있다.

멜라닌 생합성에 관련되는 여러 가지 요인들은 크게 2가지로 대별될 수 있는데 중 하나는 멜라닌 생합성의 속도조절단계 효소인 타이로시나제(tyrosinase)를 직 억제하는 요인이 있다.

티로시나제는 구리와 결합한 효소로서, 동물, 식물, 미생물 및 사람 등에 넓게 포되어 있고 모노하이드록시 또는 디하이드록시페닐알라닌 ihydorxy-phenylalanine, DOPA) 등의 페놀 화합물에서 호기적 산화를 촉진시키고, 외선에 심하게 노출된 피부에 멜라닌토스를 침착시켜 피부의 노화와 손상을 유발시는 작용을 한다. 또한 야채 또는 과실류에서도 티로시나제 등과 같은 폴리페놀옥 다제가 식품의 갈변화 현상을 초래한다.

지금까지 멜라닌 생성 저해제의 연구는 주로 티로시나제 저해제를 개발하는 방으로 집중되어 왔고, 대표적인 티로시나제 저해제로는 티로시나제 활성부위의 구리 온에 대한 킬레이트 형성물질, 퀴논류를 페놀류로 환원시키는 아스코빅산 등의 환제 그리고 티로시나제 자체를 변성시키는 비설파이트 제제 등을 들 수 있다.

이와 같이, 티로시나제 저해제가 다양한 미백제 등으로 개발되어 현재 사용되고 있지만, 여러 가지 문제점도 동시에 제기되고 있다. 실제로, 기미, 주근깨, 반점 임신기 과색소 침착과 같은 과잉 색소증 치료에 국부적으로 사용되고 있는 4-히드시아니솔 및 하이드로퀴논 등은 강력한 멜라닌 생성 저해활성은 있으나 동시에 색 세포의 변성 또는 치사를 유발하고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 타낸다. 특히 하이드로퀴논 계열의 화합물은 멜라닌 생합성을 저해하는 미백용 크으로 개발되어 사용되었으나, 세포 독성으로 인한 피부 자극 또는 피부병을 유발하 것으로 알려져 현재 일부 국가에서만 사용이 허가되고 있는 실정이다.

또한 멜라닌 생합성에 관련되는 그 밖의 요인은 타이로시네이즈에 대하여 직접인 억제효과를 나타내지 않지만, 멜라닌 색소세포내에서 타이로시나제의 발현에 작하는 전사인자를 조절하여 멜라닌 생합성을 억제하는 요인이 있다.

최근 ERK의 억제실험을 통하여 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성이 ERK의 활성화에 하여 억제될 수 있음이 보고되었으며(Englaro W, et al. Inhibition of the togen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell fferentiation. J Biol Chem, 1998, 273:9966-9970), 더 나아가 ERK의 활성화에 의 MITF의 분해가 멜라닌 생성을 억제한다고 발표되었다(Wu M, et al. c-Kit iggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the sential melanocyte factor Mi. Genes Dev 2000, 14:301-312).

이러한 요인을 이용한 멜라닌 생합성 저해제는 티로시나제를 직접 억제함으로 생하는 단점을 해결할 것으로 사료되며, 종래 개발된 멜라닌 생합성 저해제와 함께 용할 경우, 작용기전이 상이하므로 배합 적용시 상승효과를 기대할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 타이로시네이즈에 대하여 직접적인 억제효과를 나타내지 않지 멜라닌 색소세포 내에서 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 활성을 촉하여 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제함으로

미백효과를 나타내는 멜라닌 생합성 저해 물질 및 이의 제조방법을 제공하는 것이

발명의 구성 및 작용】

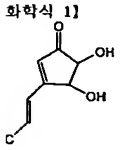
상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 테레인 화합물을 유효성분으로 하는 멜라닌 생성 저해제를 제공한다.

또한, 본 발명은 페니실리움속 곰팡이 균주로부터 테레인 화합물을 분리하는 방을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 테레인 화합물을 유효성분으로 하는 멜라 생성 저해제를 제공한다.

화학식 1】



상기 화학식 1로 표시되는 테레인 화합물은 멜라닌 생합성 저해효과를 타낸다. 첨부된 도 4a~4c에서 보는 바와 같이, 본 발명의 테레인 화합물은 종래 라닌 생합성 저해제인 코지산과 같이 농도의 증가에 따라 멜라닌 합성을 저해할 뿐

아니라 코지산에 비해 10 이상의 강한 멜라닌 합성 저해 효과를 나타냄을 알 수 다.

특히, 본 발명의 테레인 화합물은 타이로시네이즈에 대하여 직접적인 억제효과 나타내지 않지만 멜라닌 색소세포 내에서 ERK(extracellular signal-regulated nase) 활성을 촉진하여 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 현을 억제함으로써 미백효과를 나타낸다. 또한 세포에 대한 독성이 낮아 종래 티시나제를 직접 억제하는 멜라닌 생합성 저해제에 비해 부작용이 적으며, 작용기전 상이하므로 배합 적용시 상승효과를 기대할 수 있어 피부 질환 치료제, 피부 미백 또는 갈변 방지제로 유용하게 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 페니실리움속(Penicillium sp) 균주로부터 테레인 화합물을 분하는 방법을 제공한다.

구체적으로, 페니실리움속(Penicillium sp) 균주를 배양하는 단계(단계 1):

상기 단계에서 얻어진 균주 또는 이의 배양액을 얻는 단계(단계 2):

상기 단계에서 얻어진 균주 또는 이의 배양액을 에틸 아세테이트로 추출하여 에 아세테이트 추출물을 얻는 단계(단계 3); 및

상기 에틸 아세테이트 추출물을 컬럼크로마토그래피를 수행하여 청구항 1항의 레인 화합물을 얻는 단계(단계 4)를 포함하는 것으로 이루어진 테레인 화합물의 제 방법을 제공한다.

단계 1에서는 페니실리움속 균주를 배양한다.

상기 페니실리움속 균주는 토양으로부터 분리되어지는 것으로, 구체적으로 페니리움속 KCTC 26245를 사용한다. 본 단계에서 배양의 일예로는 페니실리움속 KCTC 245를 효모 맥아 추출(yeast-malt extract, YM) 배지를 이용하여 28℃, 140 rpm으 8일간 배양한다.

상기 신균주는 토양으로부터 얻을 수 있으며 이러한 균주를 멜라닌 생합성 저해성을 조사하여 1차 활성 균주를 선발하였고, 선발된 활성 균주 중에서 에텀아세테트에 의해 추출되는 활성 물질을 갖는 균주 중 활성이 가장 우수한 균주를 선발하다. 이에 본 발명자들은 상기 균주를 '곰팡이 페니실리움속 F020135'라 명명하고, 03년 8월 24일자로 한국생명공학연구원재 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 TC26245).

단계 2에서는 균주 또는 이의 배양액을 얻는 것으로, 구체적으로 균주는 상기 양된 페니실리움속 KCTC 26245를 아세톤을 이용하여 추출한 아세톤 추출물을 사용며, 또한 균주의 대사물을 함유한 배양액을 사용한다.

단계 3에서는 상기 균주 또는 이의 배양액으로부터 에텀 아세테이트 추출물을는 것이다. 상기 균주로부터 얻은 아세톤 추출물 또는 균주의 배양액에 에텀 아세이트를 이용하여 분액을 추출한 후 감압 농축하여 얻는다.

단계 4에서는 상기 얻어진 에텀 아세테이트 추출물으로부터 컬럼크로마토그래피 이용하여 테레인 화합물을 얻는다. 본 단계는 두 단계로 나누어진다.

구체적으로, 상기 단계 4는

단계 3에서 얻어진 에틸 아세테이트 추출물을 $CHCl_3$ 및 메탄올의 혼합용매를 이상으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 분획을 얻는 단계(단계 -1): 및

상기 분획을 메탄올을 이동상으로 사용하여 세파덱스-LH20 컬럼 크로마토그래피 분리하여 본 발명의 테레인 화합물을 얻는 단계(단계 4-2)로 이루어진 다.

단계 4-1에서는 이동상으로 $CHCl_3$ 및 메탄올의 혼합용매를 이용하는데, 이때 혼 비율은 $CHCl_3$:메탄올=20:1~1:1로 한다.

단계 4-2에서는 이동상으로 메탄올을 이용하는데, 바람직하게는 100 % 메탄올을 l용하여 컬럼크로마토그래피를 수행한 후 70 % 메탄올을 이용하여 다시 컬럼크로마 그래피를 수행한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 한정되는 것은 아니다.

실시예 1> 본 발명의 테레인 화합물의 제조

토양으로부터 분리한 곰팡이 균주 *페니실리움속(Penicillium sp)*배양액으로부터 본 발명 펠라닌 생합성 저해물질 화합물을 분리하였다.

구체적으로, 토양으로부터 분리한 곰팡이 균주 페니실리움속*(Penicillium sp)* 20135 균주(수탁번호 KCTC 26245)를 효모 맥아 추출(yeast-malt extract, YM) 배지

0ml을 500 ml 삼각 플라스크를 이용하여 28℃, 140 rpm으로 8일간 배양하였다. 뮬 페이퍼를 이용하여 균체와 배양액을 분리 후 균체를 동량의 아세톤을 넣어 하루밤 체한 후 다시 휠터페이퍼를 이용 균체는 버리고 감압농축하여 아세톤 추출물을 얻다. 이 아세톤 추출물과 배양액을 동량의 에틸아세테이트로 추출을 하고 감압 농하여 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.

상기에서 얻어진 에틸아세테이트 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이하여 분획을 얻었다. 이때, 용출용매 조건은 $CHCl_3$-메탄올=20:1 혼합 용매에서부 메탄올의 비율을 높여 극성을 올리며 $CHCl_3$-메탄올=1:1 혼합용매까지 용출하여 분하였다. 각 분획 중 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내는 분획만을 모았다.

상기 얻어진 활성분획을 100 % 메탄올 용매로 포화시킨 세파덱스 LH-20 컬럼 로마토그래피를 이용하여 순수 정제하였다. 이때 메탄올을 용출용매로 사용하여 분하였으며 활성분획만을 모아 화학식 1의 테레인 화합물을 얻었다(도 1 참조).

<u>본 발명 멜라닌 생합성 저해물질의 물리화학적 특성</u>

상기 화합물의 물리 화학적 특성(physico-chemical property)을 조사한 결과, 색의 분말 상태로 분리되었다.

상기 화합물의 질량(Mass) 분석 결과, 분자량은 154 임을 알 수 있었으며 이상 물리·화학적 성질과 ^1H, ^{13}C 핵자기 공명 스펙트럼(NMR spectrum) 데이터 분석 결를 근거로 본 화합물의 분자식을 $C_8H_{10}O_3$ 으로 결정하였다.

본 발명 화합물의 화학 구조

상기 화합물의 화학구조를 규명하기 위해서 ^{1}H NMR spectrum, ^{13}C NMR spectrum 비롯한 1 차원 NMR 및 HMBC spectrum과 같은 2차원 NMR 실험을 측정하였다.

본 화합물을 중수소 메탄올(CD_3OD)에 녹여 ^{1}H NMR spectrum 및 ^{13}C NMR을 측정 결과, 화학식 1의 4,5-dihydroxy-3-propenyl-2-cyclopenten-1-one의 화학구조를 는 테레인(terrein) 화합물인 것을 확인하였다.

NMR data를 분석해 본 결과, ^{13}C NMR spectrum 분석결과 19.2(CH_3) , 78.0(CH), .5(CH), 125.0(CH), 126.1(CH), 145.0 (CH), 170 , 205.5 ppm에서 8개의 carbon ak 가 관찰되었다. ^{1}H-NMR spectrum으로부터 1.94 ppm (3H, dd, J=6.9,1.5Hz), 07 ppm(1H, d, J=2.7Hz), 4.67 ppm (1H, d, J=2.7Hz), 6.0 ppm (1H, s), 6.44 ppm H, dd, J=15.6, 1.5), 6.81 ppm (1H, aq, J=6.9,15.6)에서 피크가 관찰되었다. 분량과 NMR data로부터 화학식 1의 terrein으로 구조를 결정하였다

[제예 1> 본 발명의 테레인 화합물을 함유한 크림제의 제조

수욕 내에서 스테아린산, 세토스테아릴알콜, 카프릴릭사크릭트리글리세리드, 광, 부틸렌글리콜을 비이커에 가하고, 75℃로 가온하여 유상으로 제조한 후, 미리 준한 실시예 1의 테레인 화합물, 물, 글리세린, 트윈 60, 트윈 80, 수산화칼륨을 혼하여 제조한 수상에 가하였다. 상기 용액을 1200~1500 rpm으로 10~20 분간 교반 후 냉각시키고, 상온에서 1~2일간 방치하였다. 하기 표 1에 상기 크림제 내 물들의 함량을 기재하였으며, 이때 총중량은 100 g으로 하였다.

표 1]

물질	함량(g)	물질	함량(g)
테레인 화합물	0.1	글리세린	6.0
스테아린산	3.0	트윈 60	2.5
포스테아릴알콜	2.0	트윈 80	1.0
부틸렌글리콜	3.0	수산화칼륨	0.5
정유	8.0	정류수	적량
프릴릭카프릭트리글리세라이드			3.0

실험예 1> 본 발명 화합물의 세포 독성실험

본 발명 Terrein의 세포 독성 효과를 측정하기 위하여, Mel-Ab 세포에 테레인 합물을 투여하였다.

구체적으로, Mel-Ab 멜라닌 세포는 5%의 CO_2, 37 ℃ 하에서 10%의 태아소혈청 BS), 100 nM phobol 12-myristate 13-acetate, 1 nM의 cholera toxin, 50 ㎍/mL의 트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 DMEM에서 배양하였다.

상기와 같이 배양된 Mel-Ab 멜라닌 세포에 테레인을 0, 10, 25, 50, 75, 100 uM 농도별로 24 시간 동안 처리하여 배양하였다. 그 다음, 배양배지를 제거하고 0.5 의 0.1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 사용하여 염색하고, Mel-Ab 멜라닌 포에 미치는 영향을 측정하였다. 염색되지 않은 크리스탈 바이올렛은 수 회 세척 여 제거하고, 세포에 잔존하는 크리스탈 바이올렛을 95% 에탄올 1.0 mL을 사용하여 추출하였다. 추출된 크리스탈 바이올렛의 흡광도는 엘라이자(ELISA) 리더를 사용하 590 ㎚에서 측정하여 세포의 생존력 정도를 측정하였다. 결과는 도 3에 나타내었

도 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 테레인 화합물은 100 uM 농도까지 Mel-Ab 라닌 세포에 독성을 보이지 않아 인체에 안전하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있다.

실험예 2> 본 발명 화합물의 멜라닌합성 억제 실험

상기 실험예 1에서 배양된 Mel-Ab 멜라닌 세포에 본 발명의 테레인 화합물과 표미백원료인 코지산(kojic acid)을 각각 0, 10, 25, 50, 75, 100 uM 및 0, 1, 10, 0 uM의 농도별로 처리한 후, 멜라닌의 생성을 비교하고 그 결과를 도 4a, 및 4b에 타내었다.

또한, 일반배양조건에서 배양된 Mel-Ab 멜라닌 세포와 본 발명의 테레인 화합물 처리한 Mel-Ab 멜라닌 세포를 현미경으로 관찰하고, 그 결과를 도 4c에 나타내었

도 4a, 및 4b에 보는 바와 같이, 테레인 화합물과 코지산은 농도의 증가에 따라 라닌 합성을 억제하였다. 그러나, 테레인 화합물은 10 uM 농도에서의 멜라닌 합 억제 효과가 코지산 100 uM의 농도에서의 효과보다 월등하여, 테레인 화합물은 코산에 비하여 10배 이상의 강한 멜라닌 합성 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었

또한 도 4c에 보는 바와 같이, 일반배양조건에서 정상적으로 배양된 Mel-Ab 멜닌 세포의 검은 멜라닌이 본 발명의 테레인 화합물을 처리한 Mel-Ab 멜라닌 세포에

는 농도의존적으로 강하게 감소함이 관찰되었고, 이로부터 테레인 화합물이 Mel-Ab 라닌 세포에서 멜라닌 합성을 억제함을 알 수 있었다.

실험예 3> Mel-Ab 멜라닌 세포의 ERK 활성 및 MITF분해 실험

본 발명의 테레인 화합물의 멜라닌 합성 저해 기전을 확인하기 위하여, 배양된 l-Ab 멜라닌 세포에 100 uM 농도의 테레인 화합물을 처리한 후, 0, 2, 10, 30, 60, 0, 360 분이 경과함에 따른 ERK (extracellular signal-regulated kinase)의 인산 정도에 따르는 활성화의 변화와 MITF (microphthalmia-associated transcription ctor)의 분해를 웨스턴 블럿 분석을 통하여 관찰하였다. 그 결과는 도 5에 나타내다.

도 5에 나타낸 바와 같이, Mel-Ab 멜라닌 세포에 Terrein을 처리한 후, 2 내지 분이 경과함에 따라 ERK1과 ERK2가 급격히 활성화되고 적어도 6시간동안 활성화 태가 지속되고 있다는 것을 볼 수 있었다. 더 나아가 ERK의 활성화에 따라 MITF의 현 수준이 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다.

최근 ERK의 억제실험을 통하여 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성이 ERK의 활성화에 하여 억제될 수 있음이 보고되었으며(Englaro W, et al. Inhibition of the togen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell fferentiation. J Biol Chem, 1998, 273:9966-9970), 더 나아가 ERK의 활성화에 의 MITF의 분해가 멜라닌 생성을 억제한다고 발표되었다(Wu M, et al. c-Kit

iggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev 2000, 14:301-312).

따라서 도 5를 통하여 본 발명의 미백 조성물에 포함되는 테레인 화합물이 ERK 활성화시켜 MITF를 조절함으로써 멜라닌 세포의 멜라닌 형성을 억제함으로써 미백 과를 나타냄을 알 수 있었다.

발명의 효과]

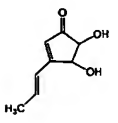
상술한 바와 같이, 본 발명은 테레인 화합물을 유효성분으로 하는 멜라닌 생성 해제에 관한 것이다. 상기 테레인 화합물은 국내 토양에 서식하는 곰팡이 페니실 움속 KCTC 26245 균주를 통하여 용이하게 제조할 수 있으며, 특히 타이로시네이즈 대하여 직접적인 억제효과를 나타내지 않지만 멜라닌 색소세포 내에서 ERK 활성을 촉진하여 MITF 의 발현을 억제함으로써 미백효과를 나타내는 것으로, 멜라닌 생성의 제작용이 기존의 물질들보다 강력하고, 작용기전이 상이하므로 배합 적용시 상승효 를 기대할 수 있어 피부 질환 치료제, 피부 미백제 또는 갈변 방지제로 유용하게 용할 수 있다.

특허청구범위】

청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 테레인 화합물을 유효성분으로 하는 멜라닌 생성 저제.

화학식 1



청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 멜라닌 생성 저해제가 피부 질환 치료제, 피부 미백제는 갈변 방지제로 사용되는 것을 특징으로 하는 멜라닌 생성 저해제.

청구항 3】

페니실리움속(Penicillium sp) 균주 KCTC 26245를 배양하는 단계(단계 1);

상기 단계에서 얻어진 균주 또는 이의 배양액을 얻는 단계(단계 2);

상기 단계에서 얻어진 균주 또는 이의 배양액을 에틸 아세테이트로 추출하여 에 아세테이트 추출물을 얻는 단계(단계 3); 및

상기 에틸 아세테이트 추출물을 컬럼크로마토그래피를 수행하여 청구항 1항의 레인 화합물을 얻는 단계(단계 4)를 포함하는 것으로 이루어진 테레인 화합물의 제

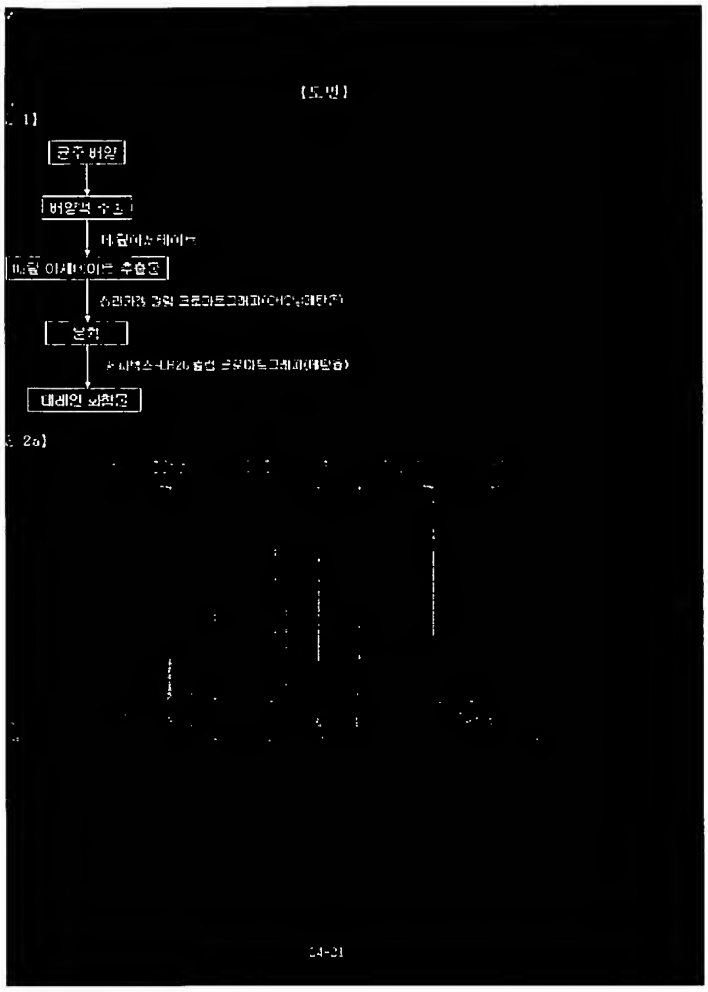
방법.

청구항 4]

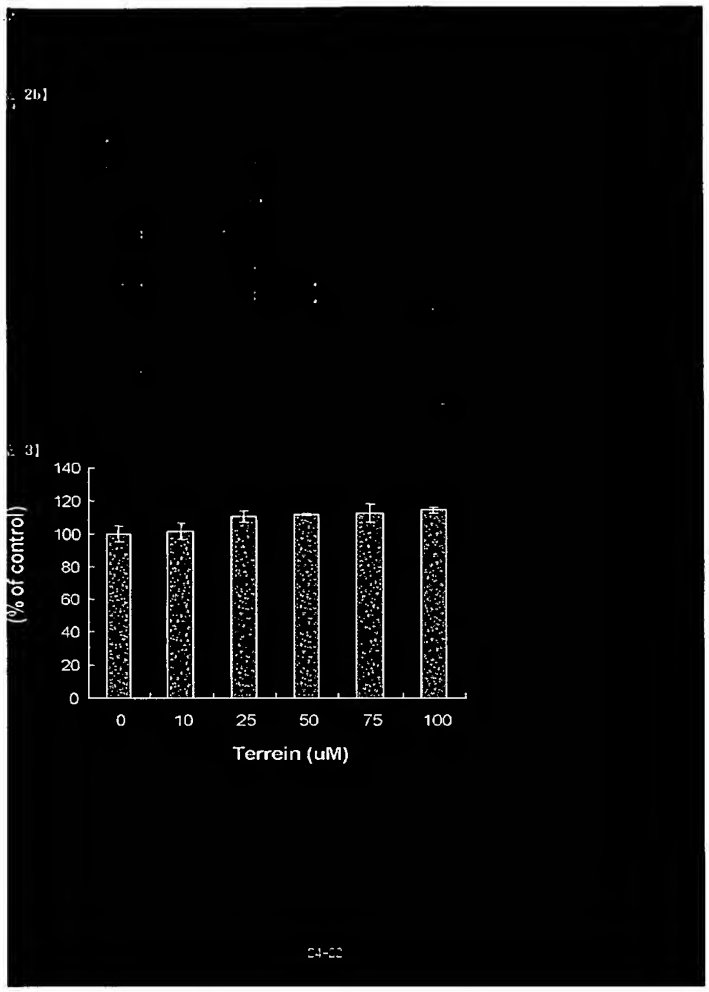
제 3항에 있어서, 상기 단계 4가

단계 3에서 얻어진 에틸 아세테이트 추출물을 $CHCl_3$ 및 메탄올의 혼합용매를 등상으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 분획을 얻는 단계(단 4-1): 및

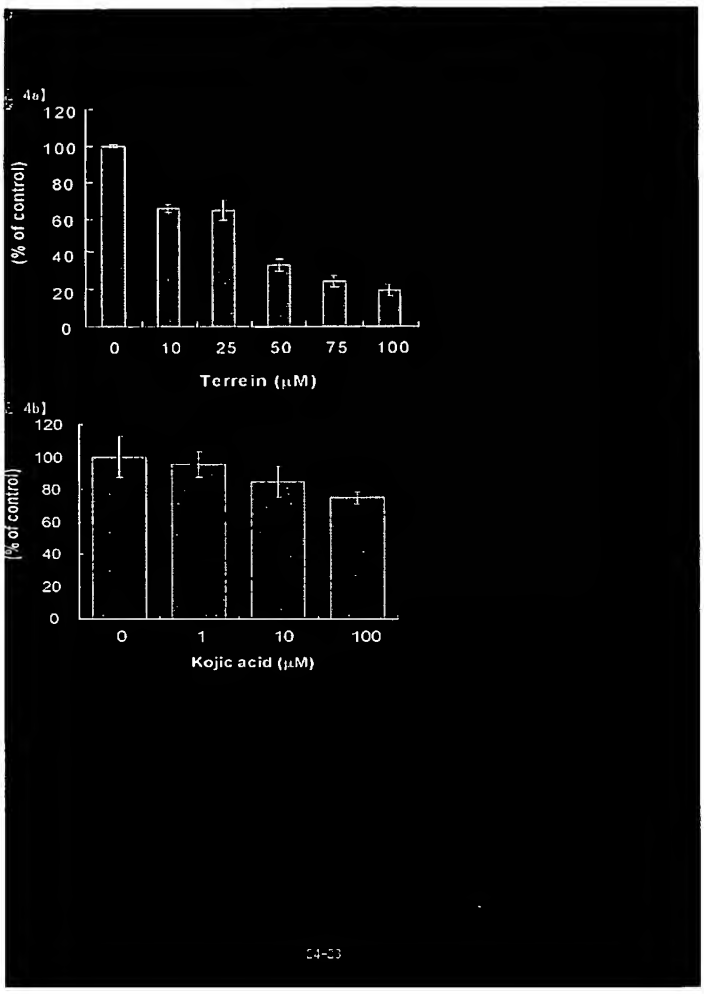
상기 분획을 메탄올을 이등상으로 사용하여 세파덱스-LH20 컬럼 크로마토그래피 분리하여 청구항 1의 테레인 화합물을 얻는 단계(단계 4-2)로 이루어진 것을 특징으로 하는 제조방법.



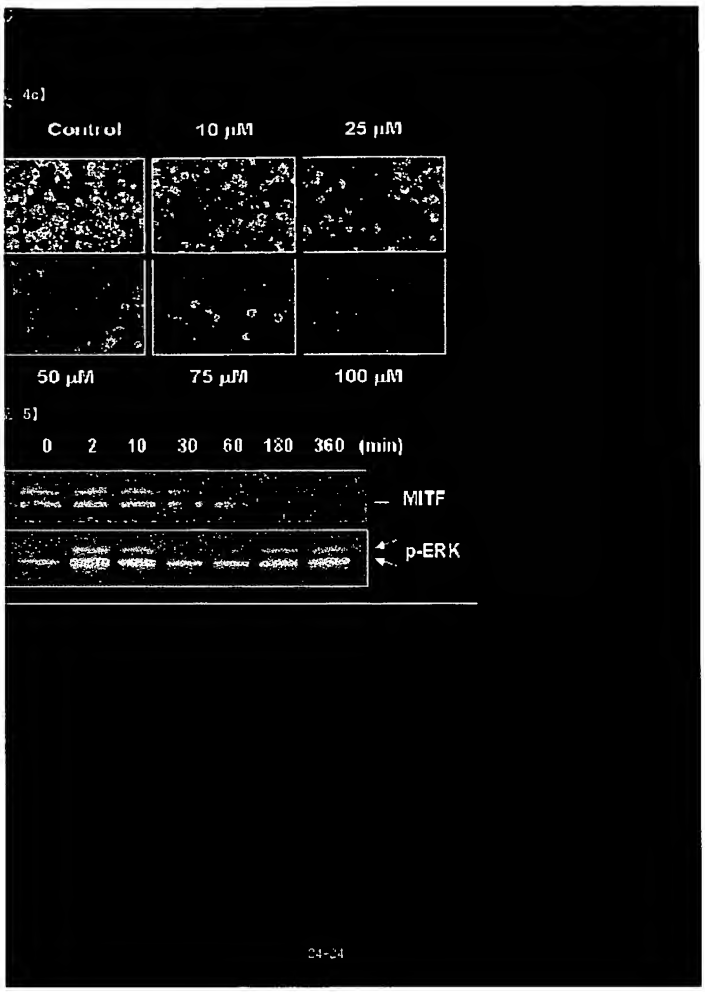
BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002677

International filing date: 19 October 2004 (19.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0090611
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 11 November 2004 (11.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)

World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse